

Composición química de los aceites esenciales de *Ocimum basilicum* L. var *basilicum*, *O. basilicum* L. var *purpurensceus*, *O. gratissimum* L., y *O. tenuiflorum* L., y su efecto antimicrobiano sobre bacterias multirresistentes de origen nosocomial

MARÍA ACOSTA¹, MARÍA GONZÁLEZ¹, MARÍA ARAQUE¹, ELSA VELAZCO¹,
NANCY KHOURI², LUIS ROJAS², ALFREDO USUBILLAGA²

Laboratorio de Bacteriología Clínica, Departamento de Microbiología y Parasitología¹.
Laboratorio de Productos Naturales, Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia², Universidad de Los Andes, Mérida 5101-A. Venezuela. Telefax: +58-0274-2403556 - 2403568. E-mail: dellap@cida.ve - usubillaga@cantv.net

RESUMEN

En esta investigación se caracterizaron químicamente los aceites esenciales de cuatro especies del género *Ocimum*: *O. basilicum* L. var *basilicum*, *O. basilicum* L. var *purpurensceus*, *O. gratissimum* L., *O. tenuiflorum* L. y se les determinó, mediante la técnica de difusión en agar perforado, la actividad antimicrobiana contra 25 cepas de *Staphylococcus aureus* y 18 cepas de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes de origen nosocomial. Los aceites esenciales se extrajeron por hidrodestilación, el análisis químico y la identificación se realizaron por cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (CG-EM). El componente mayoritario del *O. basilicum* L. var *basilicum* fue el linalol, el del *O. basilicum* L. var *purpurensceus* el (E)-cinamato de metilo, el del *O. gratissimum* L. el timol y, el del *O. tenuiflorum* L. el 4-alil anisol. Los resultados de las pruebas de susceptibilidad determinaron que la actividad inhibitoria contra las cepas probadas fue dependiente de la especie. Los aceites esenciales provenientes de *O. basilicum* L. var *basilicum* y de *O. gratissimum* L. mostraron una potente actividad inhibitoria contra las cepas de *S. aureus* y *K. pneumoniae*, probablemente debido a que en su constitución están presentes el eugenol y el timol, compuestos fenólicos a los que se les atribuye acción antibacteriana. El aceite de *O. tenuiflorum* L. presentó una difusión deficiente en el medio de cultivo; sin embargo, el mismo tuvo actividad inhibitoria sólo sobre los organismos Gram negativos. Al aceite esencial de *O. basilicum* L. var *purpurensceus* no se le detectó ninguna actividad inhibitoria sobre los

microorganismos estudiados. En este estudio se demostró que en los aceites esenciales de algunas especies de *Ocimum* podrían encontrarse principios activos útiles como alternativas terapéuticas futuras para el tratamiento de infecciones nosocomiales producidas por patógenos multirresistentes.

ABSTRACT

The essential oils from four species of genus *Ocimum*: *O. basilicum* L. var *basilicum*, *O. basilicum* L. var *purpurensceus*, *O. gratissimum* L., *O. tenuiflorum* L., were chemically characterized. Their antimicrobial activity against 25 multiresistant strains of *Staphylococcus aureus* and 18 strains of *Klebsiella pneumoniae* of nosocomial origin, was determined using the agar well diffusion method. The essential oils were extracted by hydrodistillation and the analysis and identification of components were carried out by GC-MS. The major components were: linalool in *O. basilicum* L. var *basilicum*, (E)-methyl cinnamate in *O. basilicum* L. var *purpurensceus*, thymol in *O. gratissimum* L. and 4-allyl anisole in *O. tenuiflorum* L. Susceptibility tests determined that inhibitory activity against the strains studied was species dependent. *O. basilicum* L. var *basilicum* and *O. gratissimum* L. showed a strong inhibitory activity against *S. aureus* and *K. pneumoniae* strains, probability due to the fact that they contain eugenol and thymol, phenolic compounds that are known to show antibacterial action. The oil obtained from *O. tenuiflorum* L. exhibited a deficient diffusion on culture medium. However, it only showed inhibitory activity against Gram-negative microorganisms. The essential oil from

O. basilicum L. var *purpurenscens* did not show any inhibitory activity against the bacterial strains tested. The results obtained suggest that in the essential oils of some of the *Ocimum* species, it is possible to find active compounds that could be used as therapeutic alternatives for nosocomial infections caused by multiresistant pathogens.

PALABRAS CLAVE

Aceite esencial, Actividad antimicrobiana, *Ocimum* sp., *Staphylococcus*, *Klebsiella*.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue parcialmente financiado por el Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad de Los Andes (CDCHT), a través del programa FA-192-96-07-AA.

INTRODUCCIÓN

En las últimas cuatro décadas se han realizado innumerables estudios sobre sustancias con actividad antimicrobiana, provenientes de plantas superiores con la finalidad de encontrar alternativas terapéuticas efectivas contra las infecciones producidas por microorganismos resistentes a los antibióticos (Hammer y col., 1999). En tal sentido, la búsqueda de sustancias con efecto antimicrobiano en fuentes no tradicionales, como las plantas superiores, es importante. En Venezuela se conocen 21 géneros de la familia Lamiaceae (Labiatae), que incluyen aproximadamente 80 especies las cuales se distribuyen en todo el país (Velásquez, 1997). Las especies del género *Ocimum*, conocidas comúnmente como albahacas son plantas aromáticas, que tienen importancia económica y cuyos aceites esenciales son usados en la industria de cosméticos, alimentos y productos farmacéuticos (Wagner, 1977; Harborne y Baxter, 1993). Por otra parte, a los aceites esenciales presentes en miembros de la familia Lamiaceae se les atribuyen propiedades antigripales, antipiréticas, antiespasmódicas, antidearreicas, antifúngicas y antibacterianas, entre otras (Janssen y col., 1987; García y col., 1998). Varios investigadores han reportado la actividad inhibitoria de los aceites esenciales provenientes de *Ocimum gratissimum* L. y *O. basilicum* L. sobre bacterias mesófilas, levaduras y hongos filamentosos (Sinha y Gulati, 1990; Lima y col., 1993; Lachowicz y col., 1998; Hammer y col., 1999; Nakamura y col., 1999); sin embargo, los reportes en los que se determina el poder inhibitorio de los aceites esenciales de las especies del género *Ocimum* contra bacterias que han generado mecanismos de resistencia a la terapia antibiótica convencional no existen. Es por ello

que en este estudio se realizó la caracterización de los aceites esenciales provenientes de cuatro especies del género *Ocimum*: *O. basilicum* L. var *basilicum*, *O. basilicum* L. var *purpurenscens*, *O. gratissimum* L. y *O. tenuiflorum* L., y se les determinó su actividad inhibitoria *in vitro* contra el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes de origen nosocomial.

MATERIALES Y METODOS

Recolección del material vegetal: Cuatro especies del género *Ocimum*: *O. basilicum* L. var *basilicum*, *O. basilicum* L. var *purpurenscens*, *O. gratissimum* L. y *O. tenuiflorum* L., fueron recolectadas en el Jardín de Plantas Medicinales "Dr. Luis Ruíz Terán" de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Los Andes. Estas plantas fueron previamente identificadas taxonómicamente y, muestras testigos fueron depositadas en el herbario MERF de la Facultad de Farmacia. Universidad de Los Andes.

Caracterización de los aceites esenciales.

Extracción del aceite: Empleando la Trampa de Clevenger y utilizando la técnica de hidrodestilación, se extrajeron los aceites esenciales de las partes aéreas (fundamentalmente hojas) de cada una de las plantas seleccionadas. Al culminar el proceso de extracción del aceite, éste fue almacenado a 4°C en un frasco hermético y resguardado de la luz. Análisis e identificación: Los componentes químicos de los aceites obtenidos de las cuatro especies vegetales en estudio fueron separados e identificados mediante un cromatógrafo de gases (Hewlett Packard modelo 6890 serie II), acoplado a un espectrómetro de masa (marca HP-5973) equipado con un inyector automático, y una columna HP-5 de 30 metros de largo y 0,25 mm de diámetro (Baser y col., 1997). Se empleó un programa de temperatura en el equipo, iniciándose el proceso a 60° C durante un minuto, luego se incrementó la temperatura a razón de 4° C/min hasta 200° C y seguidamente hasta 280° C a razón de 10° C/min. El inyector se mantuvo a 250° C, la relación de reparto fue de 1:100 y la presión en la cabeza de la columna fue de 14 psi. Para la identificación de los componentes de los aceites se usó la base de datos Wiley (6ª Ed.).

Determinación de los puntos de corte de la actividad inhibitoria de los aceites esenciales: Inicialmente se determinaron los puntos de corte (rango superior e inferior) de la actividad inhibitoria para cada uno de los aceites sobre cepas bacterianas de referencia (*S. aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922). Para ello, se ensayaron distintos volúmenes de cada aceite (desde 1 hasta 35 µl) en estado puro y en diferentes concentraciones (50% y 75%). Para la obtención de las distintas

concentraciones de los aceites, se utilizó como diluyente Tween 80, el cual previamente demostró no ejercer ninguna actividad inhibitoria sobre el crecimiento de las cepas bacterianas probadas. Posteriormente, se estandarizó para cada aceite, el volumen y la concentración ideal a ser utilizados en los ensayos de evaluación de la actividad antimicrobiana.

Evaluación de la actividad antimicrobiana: Microorganismos de ensayo: Para evaluar la actividad antimicrobiana de los cuatro aceites esenciales se seleccionaron 25 cepas de *Staphylococcus aureus* (Velazco y col., 2002) y 18 cepas de *Klebsiella pneumoniae* de origen nosocomial (Araque y col., 2000). Se utilizaron como cepas control *S. aureus* ATCC 25923 y *E. coli* ATCC 25922. Preparación de los inóculos microbianos: Para la preparación de los inóculos microbianos fue necesario mantener las cepas previamente purificadas en un medio básico con un tiempo de incubación no mayor de 24 horas; de éstas se tomó una pequeña cantidad de colonias, para luego ser resuspendidas en solución salina fisiológica estéril al 0.85% de cloruro de sodio hasta alcanzar la turbidez equivalente al patrón 0.5 de Mc Farland (10^6 -8 UFC/ml). Preparación de las placas: Se emplearon placas de Petri estériles con 40 ml de agar Müller Hinton sin solidificar; a cada placa se le colocó una plantilla perforadora que produjo 5 pozos de 4 mm de diámetro. Inoculación de las placas: Después de preparados los inóculos y empleando hisopos estériles, se procedió a inocular en forma de césped las bacterias en las placas de Petri previamente perforadas. Posteriormente, con una pipeta automática se procedió a colocar el aceite esencial en los pozos, siguiendo un orden correlativo ascendente en el sentido de las agujas del reloj. Una vez depositados los aceites se procedió a sellar cada pozo con agar Müller Hinton. Luego las placas se colocaron a 4° C por un tiempo de 15 minutos para facilitar la difusión del aceite. Al cabo de este tiempo, se dejaron 5 minutos en medio ambiente para finalmente ser colocados en incubación aerobia a 37° C durante 24 horas. Lectura de las pruebas: Transcurridas las 24 horas de incubación se procedió a realizar la lectura de las mismas, donde se consideró un resultado positivo cuando se observó un halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del pozo; el caso contrario se consideró negativo o resistente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez obtenidos los aceites esenciales de cada una de las especies vegetales seleccionadas se les determinó algunas características físicas y organolépticas (datos no mostrados). Todos los aceites

tuvieron un aspecto transparente y ligeramente amarillo, destacándose en dos de ellos (*O. basilicum* L. var *basilicum* y *O. basilicum* L. var *purpurescens*) un olor dulce, mientras que las especies *O. gratissimum* L. y *O. tenuiflorum* L. presentaron olores característicos a orégano y a anís, respectivamente. El rendimiento porcentual obtenido de acuerdo al peso en gramos de las hojas y la cantidad de aceite extraído fue mayor en la especie *O. gratissimum* L. (0,64%). Por el contrario, un rendimiento porcentual dos veces menor se obtuvo con *O. basilicum* L. var *purpurescens* (0,26%).

El análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas permitió conocer la composición química y la abundancia relativa de los principales componentes que conformaban los aceites estudiados. En la Tabla 1 y en la Figura 1, se muestran los componentes mayoritarios identificados en cada uno de los aceites. Los aceites provenientes de las especies *O. basilicum* L. var *basilicum* y *O. basilicum* L. var *purpurescens* presentaron 4 componentes principales, correspondiendo en cada caso a más de un 94% del aceite. De estos componentes el 1,8-cineol y el linalol fueron comunes en ambos aceites. Sin embargo, el linalol y el (E)-cinamato de metilo, fueron los componentes mayoritarios del *O. basilicum* L. var *basilicum* y del *O. basilicum* L. var *purpurescens* con un 54,28% y 55,95% respectivamente. Por otra parte, el 90,02% del aceite obtenido del *O. gratissimum* L., estuvo constituido por 8 componentes principales, donde el 43,68% estuvo representado por el timol, resultado que coincide con lo reportado por Cianguerotti y col. (1999). Por otra parte, casi la totalidad (97,58%) del aceite proveniente del *O. tenuiflorum* L. resultó ser el 4-alil anisol.

Tabla 1. Abundancia relativa de los componentes mayoritarios de los aceites esenciales de las cuatro especies vegetales pertenecientes al género *Ocimum*.

Índices de Kovat's (Adams, 1995)	Componentes mayoritarios	<i>Ocimum basilicum</i> L. var <i>basilicum</i>	<i>Ocimum basilicum</i> L. var <i>purpurescens</i>	<i>Ocimum gratissimum</i> L.	<i>Ocimum tenuiflorum</i> L.
931	α -tujeno	-	-	4,29	-
991	β -mirreno	-	-	3,56	-
1018	α -terpineno	-	-	4,52	-
1026	β -cimento	-	-	9,22	-
1033	1,8-cineol	4,21	1,44	-	-
1062	γ -terpineno	-	-	21,09	-
1089	ρ -cimeneno	-	-	2,27	-
1098	linalol	54,28	21,30	-	-
1189	4-terpineol	-	-	1,47	-
1195	4-alil anisol	26,50	-	-	97,58
1290	timol	-	-	43,68	-
1301	(Z)-cinamato de metilo	-	16,85	-	-
1356	eugenol	9,54	-	-	-
1379	(E)-cinamato de metilo	-	55,95	-	-
	Total (%)	94,53	95,54	90,02	97,58

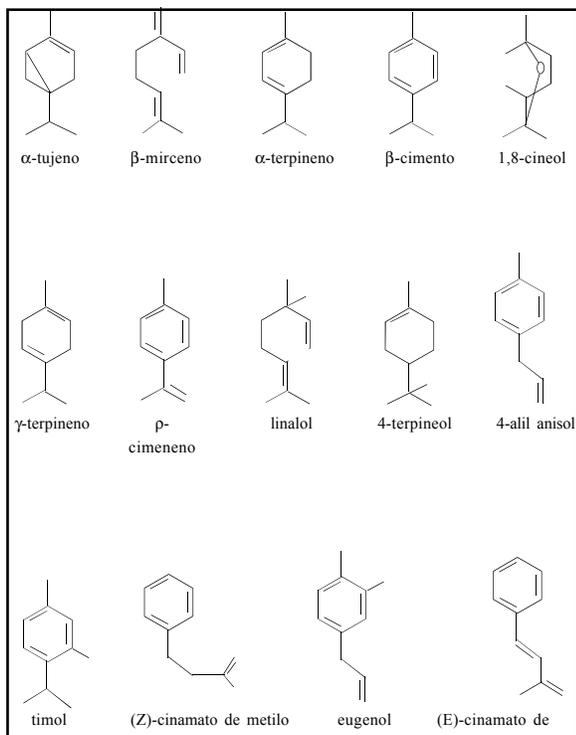


Figura 1. Estructura química de los componentes mayoritarios de los aceites esenciales de *Ocimum basilicum* L. var *basilicum*, *O. basilicum* L. var *purpurens*, *O. gratissimum* L. y *O. tenuiflorum* L.

Algunos investigadores han afirmado que los miembros de la familia Lamiaceae (Labiatae) tienen diversas propiedades médicas, entre ellas antidiarreicas, antifúngicas y antibacterianas (Vega y Carrillo, 1997; García y col., 1998). En este estudio, 43 cepas bacterianas multirresistentes (18 *K. pneumoniae* y 25 *S. aureus*) de origen nosocomial (Araque y col., 2000; Velazco y col., 2002) fueron sometidas a la actividad inhibitoria de los aceites esenciales de las 4 especies vegetales del género *Ocimum*, pudiéndose observar que la actividad inhibitoria contra las cepas probadas fue dependiente de la especie vegetal. De los 4 aceites probados, sólo los provenientes del *O. basilicum* L. var *basilicum* y *O. gratissimum* L. demostraron actividad inhibitoria sobre las cepas bacterianas Gram positivas (*S. aureus*) y las Gram negativas (*K. pneumoniae*). La distribución porcentual de la actividad inhibitoria de estos aceites esenciales se muestra en las Figuras 2 y 3. En ambos casos se pudo observar que los halos de inhibición del crecimiento bacteriano producidos por estos aceites sobre más del 70% de las bacterias Gram negativas (*K. pneumoniae*) estuvieron en el orden de 8 a 13 milímetros, mientras que, aún cuando los halos de inhibición producidos sobre las cepas de *S. aureus* fueron de igual tamaño, estos se observaron en

aproximadamente la mitad del total de éstas cepas. Estos resultados avalan lo reportado por Lachowicz y col en 1998, quienes concluyeron que el aceite esencial del *O. basilicum* L. inhibió el crecimiento bacteriano de una variedad de bacterias ácido-tolerantes provenientes de alimentos. Por otra parte, el análisis del aceite obtenido del *O. gratissimum* L. permitió evidenciar su efecto inhibitorio contra las especies Gram positivas (*S. aureus*) y Gram negativas (*K. pneumoniae*) ensayadas. Estos hallazgos también fueron observados en 1999 por el grupo de Nakamura, el cual, utilizando las técnicas de difusión en medio sólido y de concentración inhibitoria mínima, demostraron la capacidad inhibitoria del aceite del *O. gratissimum* L. en cepas de *S. aureus* y en varias especies de bacilos Gram negativos. Es posible que la actividad inhibitoria de los aceites de *O. basilicum* L. var *basilicum* y *O. gratissimum* L. sobre el grupo de cepas estudiado, se deba a que en su constitución están presentes respectivamente el eugenol y el timol, compuestos fenólicos a los que se les atribuye acción antibacteriana (Katzung, 1996). En tal sentido, hay que destacar que los puntos de corte para evidenciar la actividad inhibitoria de los aceites provenientes de *O. basilicum* L. var *basilicum* y *O. gratissimum* L. determinaron que, en las cepas de *S. aureus* los aceites se utilizaron puros, pero se diluyeron al 75% cuando se probaron sobre *K. pneumoniae*. Esto significa que probablemente el espectro de actividad de estos aceites sea más efectivo contra bacterias Gram negativas.

Por otra parte, en este estudio se pudo observar que el aceite proveniente del *O. tenuiflorum* L. no presentó actividad inhibitoria sobre el grupo bacteriano Gram positivo, no obstante, se logró evidenciar un efecto inhibitorio sobre las cepas de *K. pneumoniae*, pero los halos de inhibición formados fueron irregulares,

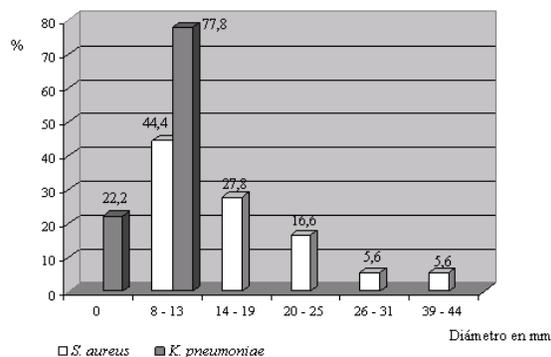


Figura 2. Distribución porcentual de la actividad inhibitoria del aceite esencial del *Ocimum basilicum* L. var *basilicum* en el crecimiento de cepas de *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* de origen nosocomial.

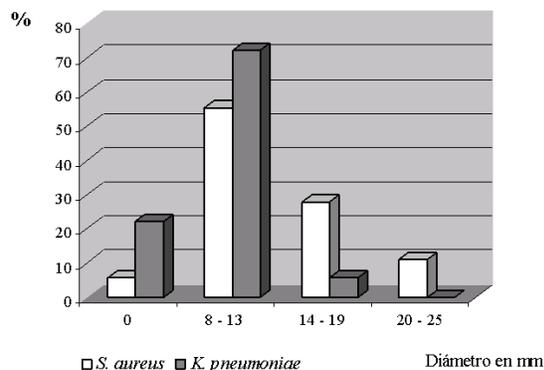


Figura 3. Distribución porcentual de la actividad inhibitoria del aceite esencial del *Ocimum gratissimum* L. en el crecimiento de cepas de *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* de origen nosocomial.

dificultándose así su lectura. Es probable que el componente mayoritario del aceite esencial del *O. tenuiflorum* L., el 4-alil anisol, tenga actividad inhibitoria, pero debido a su alta concentración en este aceite (97.58%), no se difunde con facilidad en el medio de cultivo. A pesar de que el 1,8-cineol y el linalol, fueron también dos de los cuatro componentes mayoritarios comunes en el aceite de *O. basilicum* L. var *basilicum* y *O. basilicum* L. var *purpurescens*, este último no mostró poder inhibitorio sobre las cepas ensayadas. Este resultado permite inferir que quizás la concentración de estos componentes mayoritarios es determinante para la inhibición del crecimiento bacteriano, o por el contrario, el 4-alil anisol y el eugenol sean los componentes claves en el efecto inhibitorio demostrado por el aceite de *O. basilicum* L. var *basilicum* (Tabla 1 y Figura 2).

Aun cuando existen numerosos estudios que confirman la actividad inhibitoria de aceites provenientes de *O. basilicum* L. var *basilicum* y *O. gratissimum* L. sobre una variedad de cepas bacterianas (Nakamura y col., 1999), éste es el primer estudio que se realiza para evaluar la actividad inhibitoria de los aceites esenciales de 4 especies del género *Ocimum* contra cepas de *S. aureus* y *K. pneumoniae* multirresistentes de origen nosocomial.

CONCLUSIONES

1. De acuerdo al análisis cromatográfico y de espectrometría de masas, el linalol, el (E)-cinamato de metilo, el timol y el 4-alil anisol, fueron los componentes mayoritarios en los aceites del *O. basilicum* L. var *basilicum*, *O. basilicum* L. var *purpurescens*, *O. gratissimum* L. y *O. tenuiflorum* L. respectivamente.

2. La actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano de los aceites esenciales fue dependiente de la especie.

3. Los aceites esenciales de *O. basilicum* L. var *basilicum* y de *O. gratissimum* L. mostraron actividad inhibitoria sobre varias cepas de *S. aureus* y de *K. pneumoniae* multirresistentes de origen nosocomial.

4. El aceite esencial del *O. tenuiflorum* L., presentó actividad inhibitoria dudosa sólo sobre las cepas Gram negativas (*K. pneumoniae*), produciendo halos de inhibición irregulares que dificultaron su lectura, probablemente ocasionada por una mala difusión del 4-alil anisol en el medio de cultivo.

5. Al aceite del *O. basilicum* L. var *purpurescens* no se le detectó ninguna actividad inhibitoria sobre los microorganismos estudiados.

6. En los aceites esenciales de algunas de las especies de *Ocimum* podrían encontrarse principios activos utilizables como alternativas terapéuticas futuras para el tratamiento de las infecciones nosocomiales. Por ello sería interesante intensificar las investigaciones en este aspecto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, R.P. 1995. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy.** Allured Publishing. Illinois. USA.
- Araque, M., Nieves, B., Lauretti, L. and Rossolini, G.M. 2000. **Molecular basis of extended-spectrum β -lactamase production in nosocomial isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Mérida, Venezuela.** Int. J. Antimicrob. Agents 15:37-42.
- Baser, K.H.C., Özek, T., Nuriddinov, K.H.R., Nigmatullaev, A.M., Khadzimatov, K.K.H. and Aripov, K.H. 199. **Essential oils of *Mediasia macrophylla* (Regel et Schmalh) Pimen. and *Foeniculum vulgare* Miller from Uzbekistan.** J. Essential Oil Res. 9: 249-250.
- Cianguerotti, C., Guillen, J., Meccia, G., Khouri, N. y Rojas, L., 1999. **Análisis de los componentes mayoritarios del aceite esencial del *Ocimum gratissimum* L.** Rev. Facultad de Farmacia. 37: 11-13.
- García, D., Pupo, S., Crespo, M. y Fuentes, L. 1998. **Estudio farmacognóstico de *Ocimum gratissimum* L. (orégano cimarrón).** Rev. Cubana Planta Médica. 3:31-36.
- Hammer, K.A., Carson, C.F. and Riley, T.V., 1999. **Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts.** J. Applied Microbiol. 86: 985-990.
- Harborne, J.B. and Baxter, H., 1993. **Phytochemical Dictionary.** Tailor & Francis. London.
- Janssen, A.M., Scheffer, J.J.C. and Baerheim Svendsen, A. 1987. **Antimicrobial activity of essential oils: A 1976-1986 literature review. Aspects of the test methods.** Planta Med. 53:395-397.
- Katzung, B. 1996. **Farmacología básica y clínica.** Editorial Manual Moderno. Sexta Edición. pp 916.

Lachowicz, K. J., Jones, G.P., Briggs, D.R., Bienvenu, F.E., Wan, J., Wilcock, A. and Coventry, M.J. 1998. **The synergistic preservative effects of the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) against acid-tolerant food microflora.** Lett. Appl. Microbiol. 26: 209-214.

Lima, E.O., Gompertz, O.F., Giesbrecht, A.M. and Paulo, Q.M. 1993. **In vitro antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes.** Mycoses. 36: 333-336.

Nakamura, C.V., Ueda-Nakamura, T., Bando, E., Melo, A.F., Cortez, D.A. and Filho, B.P. 1999. **Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 94: 675-678.

Sinha, G.K. and Gulati, B.C. 1990. **Antibacterial and antifungal study of some essential oils and some of their constituents.** Indian Perfumer. 34: 126-129.

Vega Montalvo, R. y Carrillo Domínguez, C. 1997. **Efectos sobre la motilidad intestinal y toxicidad aguda oral del extracto fluido de *Ocimum gratissimum* L. (Orégano Cimarrón).** Rev. Cubana Planta Médica. 2:14-18.

Velazco, E; Nieves, B; Araque, M y Calderas, Z. 2002. **Epidemiología de infecciones nosocomiales por *Staphylococcus aureus* en una unidad de alto riesgo neonatal.** Enferm. Infec. Microbiol. Clin. 20:321-325

Velázquez, D. 1997. **Clave para los géneros de Lamiaceae en Venezuela.** Acta Bot. Venez. 20:1-42.

Wagner, H. 1977. **Pharmaceutical and economic use of the Labiatae and Rutaceae Families.** Rev. Latinoam. Quim. 8: 16-25.